

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



555069

(43)国際公開日
2004年11月11日 (11.11.2004)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2004/096247 A1

(51)国際特許分類⁷:

47/32, 47/34, 47/38, 47/48, A61P 19/02, 29/00, 37/02,
37/08, 35/00, 37/04, 43/00

A61K 35/74,

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 北原慎一郎
(KITAHARA, Shinichiro) [JP/JP]; 〒6188589 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内
Osaka (JP). 新村和夫 (SHINMURA, Kazuo) [JP/JP]; 〒6188589 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水
化学工業株式会社内 Osaka (JP). 阿部佳子 (ABE, Yoshiko) [JP/JP]; 〒6188589 大阪府三島郡島本町百山
2-1 積水化学工業株式会社内 Osaka (JP). 栗山澄 (KURIYAMA, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒6188589 大阪府三島
郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内 Osaka (JP).

(21)国際出願番号:

PCT/JP2004/005983

(22)国際出願日:

2004年4月26日 (26.04.2004)

(25)国際出願の言語:

日本語

(26)国際公開の言語:

日本語

(30)優先権データ:

特願2003-124344 2003年4月28日 (28.04.2003) JP
特願2003-276831 2003年7月18日 (18.07.2003) JP

(74)代理人: 宮崎主税, 外 (MIYAZAKI, Chikara et al.);
〒5400012 大阪府大阪市中央区谷町1丁目6番5号
西村ビル Osaka (JP).

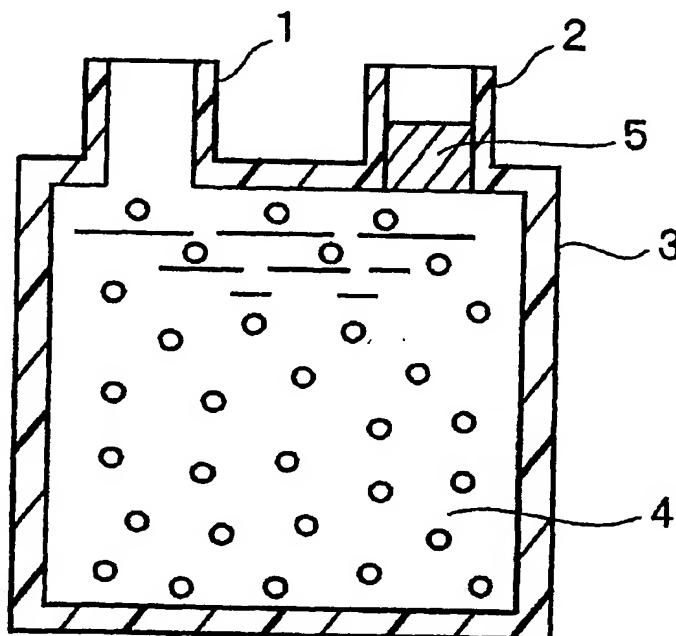
(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 積水
化学工業株式会社 (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒5308565 大阪府大阪市北区西天満2丁目
4番4号 Osaka (JP).

(81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

[統葉有]

(54)Title: INSTRUMENT FOR INDUCING CYTOKINE AND METHOD OF INDUCING CYTOKINE

(54)発明の名称: サイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法



(57)Abstract: It is intended to provide a novel instrument for inducing a cytokine and a method of inducing a cytokine by which a cytokine can be effectively induced compared to the existing cytokine induction therapy. Namely, an instrument for inducing a cytokine which contains a hemolytic streptococcus and/or a hemolytic streptococcus-origin component and a water-insoluble support; and a method of inducing a cytokine by using this instrument for inducing a cytokine.

[統葉有]

WO 2004/096247 A1



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 従来のサイトカイン誘導療法に比べてより効果的にサイトカインを誘導し得る新規なサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法を提供することを目的とする。溶連菌及び/又は溶連菌由来成分と、水に不溶性の担体とを含むサイトカイン誘導用具及び該サイトカイン誘導用具を用いてサイトカインを誘導する方法。

明細書

サイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法

5 技術分野

本発明は、サイトカイン誘導療法等に用いられ、効果的にサイトカインを誘導し得るサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法に関する。

10 背景技術

サイトカインは、多種多様な細胞間情報伝達因子の総称である。サイトカインとしては、例えば、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ (IFN- γ)、インターロイキン1～インターロイキン27、腫瘍壞死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α 、TNF- α)、腫瘍壞死因子- β (Tumor Necrosis Factor- β)、トランスフォーミング増殖因子- α (Transforming Growth Factor- α)、トランスクローミング増殖因子- β (Transforming Growth Factor- β 、TGF- β)、各種細胞増殖因子等が挙げられる（臨床免疫第27巻特別増刊号1995年「サイトカインのすべて」科学評論社、臨床免疫第36巻、39-44、2001年及び臨床免疫第39巻、189-200、2003年）。

サイトカインは生体内で様々な活性を有し、様々な疾患に関与していることが知られている。このようなサイトカインの活性を生体内で惹起して疾患の治療を行う、サイトカイン誘導療法が従来より行われている。サイトカイン誘導療法では、患者に、サイトカイン誘導剤を投与し、生

体内においてサイトカインの誘導を引き起こす。このようなサイトカイン誘導療法に用いられるサイトカイン誘導物質としては、様々な物質が知られている。例えば、微生物由来のサイトカイン誘導物質としては、OK-432、BCG、ベスタチン、丸山ワクチン、ロムリチド等が知られており、担子菌類由来のサイトカイン誘導物質としては、クレスチン、レンチナン、シゾフィラン等が知られている。

例えば、OK-432やBCG等は血液等からインターロイキン1やインターフェロン γ 等のサイトカインを誘導することが知られている（岐阜大医紀43：166-177、1995年及びMolecular medicine Vol. 36、臨時増刊号、220-229、1999年）。

しかしながら、上述したサイトカイン誘導療法では、生体内でサイトカインを誘導することはできるが、充分量のサイトカインを誘導することが困難であり、強い効力を発揮させ難いという問題があった。また、サイトカインを効果的に誘導するために、サイトカイン誘導剤の投与量が多くなり、副作用が大きくなり、治療を有効に行い得ないという問題もあった。

一方、特開昭61-277628号公報には溶連菌の一種であるOK-432を不溶性担体に共有結合で結合してなる癌治療用白血球刺激材が示されているが、これは腫瘍障害性細胞を誘導するものであり、この先行技術ではサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法については全く述べられていない。

発明の開示

本発明は、上記現状に鑑み、従来のサイトカイン誘導療法に比べてより効果的にサイトカインを誘導し得る新規なサイトカイン誘導用具及び

サイトカイン誘導方法を提供することを目的とする。

本発明は、上記課題を達成するためになされたものであり、本発明に係るサイトカイン誘導用具は、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と、水に不溶性の担体とを含むこと特徴とする。

5 また、本発明に係るサイトカイン誘導方法は、本発明に従って構成されたサイトカイン誘導用具を用いてサイトカインを誘導することを特徴とする。

本願発明者らは、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と水に不溶性の担体とが、著しく高いサイトカイン誘導量を示すことを見いだし、本発明
10 を完成した。

以下に本発明を詳述する。

本発明のサイトカイン誘導用具は、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と、水に不溶性の担体とを含む。

上記担体としては特に限定されず、水に不溶性であればよい。担体を構成する材料としては、例えば、無機物材料、有機物材料、金属等が挙げられ、好ましくは無機物材料及び有機物材料であり、また、無機物材料の中では炭素材料が好ましく、有機物材料の中では高分子材料が好ましく、さらに、これらの中でも活性炭が好ましい。

上記無機物材料としては、例えば、活性炭などの炭素材料、ガラス若しくはガラスの誘導体、シリカ系組成物、アルミナ、ヒドロキシアパタイト等が挙げられる。中でも、炭素材料が好ましく、さらに、炭素材料の中でも活性炭が好ましい。

上記炭素材料は、従来公知の任意の方法により、有機化合物を焼成して得られた炭化物である。また、活性炭は、上記炭化物を賦活化させ、
25 多孔性としたものである。賦活化の方法としては特に限定されず、従来公知の任意の方法が採用できる。例えば、高温水蒸気により賦活化さ

せる方法、薬品により賦活化させる方法等が挙げられる。尚、賦活化は、比表面積が $800\text{ m}^2/\text{g}$ 以上になるようを行うのが好ましい。

上記炭素材料の原材料となる有機化合物としては特に限定されず、その中でも活性炭の原材料としては、例えば、石油ピッチ、石炭、木材、
5 ヤシガラ、おがくずなどの他、フェノール樹脂、塩化ビニル樹脂、アクリル樹脂、塩化ビニルデン樹脂などの合成樹脂等が挙げられ、中でも、石油ピッチ、石炭、ヤシガラ及びフェノール樹脂が好ましく、より好ましくは、石油ピッチ及びフェノール樹脂である。

上記活性炭は、球状或いは非球状の種々の形状のものがあり、その形状は特に限定されない。尚、非球状としては、例えば、ペレット状、円柱状、円筒状、破碎状、纖維状等が挙げられる。また、上記活性炭は、必要に応じて、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ニトロセルロース、ヒドロキシエチルセルロースなどの非水溶性高分子材料によりコーティングされていてもよい。

15 上記活性炭の径は、 $100\text{ }\mu\text{m}$ を超える、 $10000\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。この場合活性炭の径とは、球状の場合には、粒径を意味し、活性炭が球状以外の非球状である場合には、長軸径及び短軸径の少なくとも一方が $100\text{ }\mu\text{m}$ を超える、 $10000\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることが望ましいことを意味し、より好ましくは、非球状である場合には、長軸径
20 及び短軸径の双方が $100\text{ }\mu\text{m}$ を超える、 $10000\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。

上記活性炭が球状の場合、その粒径が、 $100\text{ }\mu\text{m}$ 以下になるとサイトカイン誘導増強効果が低下するので、下限が $100\text{ }\mu\text{m}$ 超であるのが好ましく、また、上限が $10000\text{ }\mu\text{m}$ であるのが好ましく、より好ましくは上限が $2000\text{ }\mu\text{m}$ である。尚、球状とは完全な球状である必要はなく、完全な球状でない場合には、活性炭が接して収まる球を想定し、

その球の直径を活性炭の粒径とする。

上記活性炭が纖維状以外の非球状の場合、その長軸径及び短軸径は、
100 μm 以下になるとサイトカイン誘導増強効果が低下するので、長
軸径は、下限が100 μm 超であるのが好ましく、また、上限が100
5 000 μm であるのが好ましく、より好ましくは上限が4000 μm であ
り、短軸径は、下限が100 μm 超であるのが好ましく、また、上限が
10000 μm であるのが好ましく、より好ましくは上限が2000 μm であ
る。尚、非球状の活性炭の長軸径及び短軸径は、非球状の活性炭
の幅が最も大きい方向を高さ方向として、活性炭が接して収まる円柱を
10 想定し、その円柱の高さを長軸径、底面の円の直径を短軸径とする。ま
た、長軸径と短軸径とは同一の値となってもよい。

本発明でいう粒径、長軸径及び短軸径は、電子顕微鏡などで拡大し、
実際に測定を行ってもよいが、以下のふるい分け方法により、本発明で
いう粒径、短軸径及び長軸径が上記範囲である活性炭を得ることができ
15 る。

まず、ふるいの目開きの最大径が、100 μm 、2000 μm 、40
00 μm 、10000 μm である、内径200 mmのステンレス製のふ
るいを用意する。一方、径を測定しようとする活性炭から10～100
gを試料として採取する。その際、活性炭が吸湿により凝集している試
20 料については、試料の本質を損なわない条件で乾燥させる。

次に、目開きの最大径が100 μm のふるいの上に、目開きの最大径
が2000 μm のふるいを積み重ね、その上に目開きの最大径が400
0 μm であるふるいを積み重ね、さらにその上に目開きの最大径が10
000 μm であるふるいを積み重ねる。その後、最上部の目開きの最大
25 径が10000 μm のふるいに上記試料を投入し、積み重ねたふるいを
一体にして5分間ふるいを行う。

ふるいを行った後、以下の通り、ふるい上の残分を収集する。活性炭が球状である場合は、最大目開きが $100\text{ }\mu\text{m}$ のふるい上の残分が、粒径が下限 $100\text{ }\mu\text{m}$ 超、上限 $2000\text{ }\mu\text{m}$ のものであり、最大目開きが $100\text{ }\mu\text{m}$ 、 $2000\text{ }\mu\text{m}$ 及び $4000\text{ }\mu\text{m}$ のふるい上の残分を合わせたものが、粒径が下限 $100\text{ }\mu\text{m}$ 超で上限 $10000\text{ }\mu\text{m}$ のものである。
活性炭が非球状である場合は、最大目開きが $100\text{ }\mu\text{m}$ のふるい上の残分が、長軸径の下限 $100\text{ }\mu\text{m}$ 超、上限 $4000\text{ }\mu\text{m}$ であるとともに、短軸径の下限 $100\text{ }\mu\text{m}$ 超、上限 $2000\text{ }\mu\text{m}$ のものであり、最大目開きが $100\text{ }\mu\text{m}$ 、 $2000\text{ }\mu\text{m}$ 及び $4000\text{ }\mu\text{m}$ のふるい上の残分を合わせたものが、長軸径の下限 $100\text{ }\mu\text{m}$ 超、上限 $10000\text{ }\mu\text{m}$ であるとともに、短軸径の下限 $100\text{ }\mu\text{m}$ 超、上限 $10000\text{ }\mu\text{m}$ のものである。尚、上記のふるい分け方法によっても、上記粒径、長軸径及び短軸径以外の径のものも混入する恐れがあるが、それが実質的に無視できる量であれば混入していても差し支えない。

また、上記活性炭は纖維状であってもよい。その場合、活性炭は、布状、網状、シート状、中空糸状等の公知の形状のものを用いることができる。

上記高分子材料としては、例えば、セルロース系、アガロース系、デキストラン系、ポリスチレン系、ポリアクリルエステル系、ポリエチレンテレフタート系などのポリエステル系、ナイロン系などのポリアミド系、ポリビニルアルコール系、ポリスルホン系、ポリアクリロニトリル系、ポリウレタン系、ポリエチレン系、ポリプロピレン系、ポリ塩化ビニル系等の材料が挙げられ、中でも、セルロース系、ポリスチレン系、ポリアクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、ポリビニルアルコール系、ポリプロピレン系及びポリ塩化ビニル系のものが好ましく、より好ましくはポリスチレン系、ポリアクリルエステル系、ポリプロピ

レン系及びポリ塩化ビニル系のものである。

上記ポリスチレン系の高分子材料としては、例えば、ジビニルベンゼンースチレン共重合体等が挙げられ、上記ポリアクリルエステル系の高分子材料としては、例えば、ポリメチルメタクリレート、ポリヒドロキシエチルメタクリレート等が挙げられる。
5

上記担体が高分子材料からなる場合、その大きさは、粒子状である場合は、粒径が下限は $100\text{ }\mu\text{m}$ 、上限は $2000\text{ }\mu\text{m}$ であるのが好ましい。また、纖維状である場合は、纖維径が $10\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることが好ましく、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることがより好ましい。さらに、上記担体が
10 繊維状の高分子材料からなる場合は不織布であることが好ましいが、不織布である場合、纖維径は $3\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。

上記金属としては、例えば、金若しくは金合金、銀若しくは銀合金、チタン若しくはチタン合金、ステンレス等が挙げられる。

さらに、特開昭61-277628号公報の癌治療用白血球刺激材では、白血球が吸着しない担体を用いることが好ましいと考えられるのに對して、本発明の担体は、白血球等を吸着する材料からなることが好ましい。白血球を吸着する材料としては、無機物材料の中では、例えば、活性炭などの炭素材料、ガラス若しくはガラスの誘導体等が挙げられ、有機物材料の中では、例えば、ポリスチレン系、ポリアクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、ポリビニルアルコール系、ポリプロピレン系、ポリ塩化ビニル系、酢酸セルロースなどのセルロース系等の高分子材料が挙げられ、中でも、活性炭、ポリスチレン系、ポリアクリルエステル系、ポリプロピレン系及びポリ塩化ビニル系高分子材料が好ましく、より好ましくは活性炭である。
20

25 上記担体は無極性であり、疎水性であっても親水性であってもよい。疎水性である場合、活性炭又はポリスチレン系又はポリアクリルエステ

ル系又はポリプロピレン系又はポリ塩化ビニル系高分子材料からなるのが好ましく、活性炭からなるのがより好ましい。また、これら担体に表面修飾や表面コーティング等を行うことで、表面に親水性を付与することができる。

5 上記担体の形状としては特に限定されず、例えば、粒子状、纖維状、不織布状、スポンジ状、膜状、シート状、中空糸状等の公知の形状を用いることができ、中でも粒子状及び纖維状が好ましい。

上記担体は、表面粗さが付与されたものであることが好ましく、表面粗さは、構成材料の多孔性等に由来するものであるのが好ましい。

10 上記担体に用いられる多孔性の構成材料としては活性炭が好ましく、その他にも、例えば、ポリスチレン系、ポリアクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、セルロース系、ポリビニルアルコール系、ポリプロピレン系及びポリ塩化ビニル系等の高分子材料が挙げられるが、好ましくは活性炭である。

15 また、上記担体の表面粗さは、構成材料が纖維状材料である場合の纖維形状に由来するものであっても良く、その場合、上記担体は、纖維状材料からなる不織布状であるのが好ましい。上記纖維状材料としては、例えば、活性炭などの炭素材料の他、ポリスチレン系、ポリアクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、セルロース系、ポリビニルアルコール系、ポリプロピレン系、ポリ塩化ビニル系等の高分子材料からなるものが挙げられるが、好ましくは活性炭及びポリスチレン系、ポリアクリルエステル系、ポリプロピレン系及びポリ塩化ビニル系の高分子材料であり、これらの好ましい高分子系材料の少なくとも一種からなる担体が好適に用いられ、上記担体を構成する材料としては、より好ましくは活性炭である。

上記溶連菌は、溶血性連鎖球菌に属する菌であり、好ましくはA群 β

溶血性を示す化膿性連鎖球菌であり、より好ましくは、 streptococcus · pneumoniae に属する菌である。例えば、 streptococcus · pneumoniae (A群3型) Su 株ペニシリン凍結乾燥粉末からなる菌体成分である OK-432 等が挙げられる (特開昭49-48822号公報)。

また、上記溶連菌由来成分としては、モノクローナル抗体を CNBr 活性化セファロースに結合させた粒子をカラム担体としてアフィニティーカロマトグラフ法により抽出・精製した OK-432 由来成分である OK-PSA (J. Immunother. 2000, Jan; 23(1), 94-103) や、溶連菌をメタノール、エタノール、アセトン、酢酸エチル、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、クロロホルム等の有機溶媒に接触させて得られる有機溶媒への可溶性成分、その不溶性成分等が挙げられる。また、溶連菌を水、生理食塩水、リンや、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどの無機塩が溶解した水溶液等に接触させて得られる水溶液への可溶性成分、又は、その不溶性成分等も本発明における溶連菌由来成分に含まれる。

また、上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分のみではサイトカイン誘導能を充分に発揮し得ないものであっても、上記水に不溶性の担体と組み合わせて用いることにより、サイトカイン誘導活性を発揮させることもできる。

上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分は、上記担体の表面に固定化するのが好ましい。固定化は、物理吸着、共有結合、イオン結合等の公知の方法を用いることができるが、固定化方法の簡便さから物理吸着が好ましい。また、共有結合等の場合には必要に応じて、上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と、担体との結合部に任意の長さをもつスペーサーを導入することもできる。

上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分は、必要に応じて、固定化する前に菌体の洗浄操作や破碎操作、成分分画操作等のさまざまな前処理が施されてもよい。また、OK-432は増殖能を有さない生菌であるが、より安全性を高めるために、必要に応じて、固定化する前、固定化と同時、又は、固定化の後のいずれの時点でも、加熱処理、薬品処理、放射線処理、ガス滅菌処理等のさまざまな方法により死菌化してもよい。上記加熱処理としては、例えば、オートクレーブ処理等が挙げられ、上記薬品処理としては、例えば、グルタルアルデヒド処理、ホルマリン処理、エタノール処理等が挙げられ、上記放射線処理としては、例えば、 γ 線処理等が挙げられ、上記ガス滅菌処理としては、エチレンオキサイドガス処理等が挙げられる。これらの処理のうち、薬品処理であるホルマリン処理が、従来より消毒液等として使われており、安全で、かつ、菌体自身を極めて安定化するため好ましい。

上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分を上記担体に固定化する場合には、菌体表面外壁成分のアミノ酸や糖成分等を介して、上記担体のカルボキシル基、アミノ基及び／又はエポキシ基等の官能基に結合してもよい。この際、必要に応じてさまざまな鎖長や構造のスペーサーを導入することもできる。

上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分を、上述した前処理により、その表面が電荷を帯びている状態にした場合には、その対極電荷を表面に有する担体にイオン結合作用によって固定化することもできる。

本発明においては、好ましくは、サイトカイン誘導用具は、上記担体と、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分とを収納する容器を更に備える。本発明のサイトカイン誘導用具を構成する容器内に、サイトカインを産生する細胞を添加して、サイトカインを誘導するサイトカイン誘導方法もまた本発明に含まれる。

なお、容器内に溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と上記担体とが収納されている場合に、好ましくは、これらは容器において併存されていることが望ましい。すなわち、サイトカインを産生する細胞と、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と担体とが同時的に接触されるように構成されていることが好ましい。もっとも、本発明においては、上記容器は必ずしも必須ではなく、容器を有しないものであってもよい。更に、容器が用いられる場合であっても、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と、上記担体とが該容器内でサイトカインを産生する細胞と接触されるように構成される必要も必ずしもない。

なお、上記サイトカインを産生する細胞としては、本発明に係るサイトカイン誘導用具を用いることによりサイトカインの産生が誘導される様々な細胞を広く含むものとする。このようなサイトカインを産生する細胞としては、血液、血液成分及びサイトカインを産生することのできる様々な細胞が挙げられ、血液から分離された白血球や血小板などに限らず、骨髄系細胞、樹状細胞、表皮細胞、纖維芽細胞、肝細胞、骨芽細胞、血液幹細胞、胚性幹細胞等の組織から採取した細胞や培養細胞、株化細胞、サイトカインを産生する様々な細胞等を含有するものを指す。

本発明の本発明のサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法における血液とは血液や血液を適当な希釈液、例えば生理食塩水や培地、緩衝液等で希釈しているものを指す。血液に抗凝固剤や添加物を加えていても良い。

本発明のサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法における血液成分とは血液から分離された白血球や血小板などに限らず、骨髄系細胞、樹状細胞、血液幹細胞、血液細胞由来株化細胞等を含有するものを指す。これらは単独で使用することもできるし、別途取りだした白血球等を血液等に混ぜ合わせて使用しても良い。また、適当な希釈液、例え

ば生理食塩水や培地、緩衝液等でこれらの細胞を希釈して本発明に用いても良いが、好ましくは血液を用いる。

なお、以下の説明においては、説明を分かり易くするために、サイトカインを産生する細胞として、血液又は血液成分等を用いた例を取り上げて説明することとする。

上記担体の使用割合としては特に限定されないが、粒子状の担体として用いる場合には、血液又は血液成分等の容積に対する担体のかさ体積量として、下限は0.02%が好ましく、より好ましい下限は0.1%であり、上限は80%が好ましく、より好ましい上限は50%である。

上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分の使用割合としては特に限定されないが、例えば、OK-432を用いる場合は、血液又は血液成分等に添加される濃度として、下限は0.0001KE/mLが好ましく、上限は10KE/mLが好ましい。

本発明のサイトカイン誘導用具を用いてサイトカインを誘導する場合、上記担体と溶連菌及び／又は溶連菌由来成分とを含む容器内にて、血液又は血液成分等と接触し、それによって血液又は血液成分等の中でサイトカインが効果的に誘導されるが、この場合、接触温度を下限は15℃、上限は42℃の範囲とすることが好ましく、それによって、サイトカインの誘導をより効果的に引き起こすことができる。

本発明のサイトカイン誘導用具で好ましく用いられる容器の構造は特に限定されないが、図1に模式的に示すように、血液又は血液成分等の導入部1と、サイトカインを誘導した血液又は血液成分等4を容器外に導く導出部2とが備えられている容器3が好ましい。

上記容器としては、硬質のカラム状容器や軟質の血液バッグ状の容器等がより好ましい。

また、本発明のサイトカイン誘導用具で用いられる容器は、サイトカ

インを誘導した血液又は血液成分等を容器外に導く場合に、サイトカイン誘導用具を構成する水に不溶性の担体並びに溶連菌及び／又は溶連菌由来成分が血液又は血液成分等に混入しないような、流出防止機構が備えられていることが好ましい。

5 図1に模式的に示すように、流出防止機構5は、サイトカイン誘導用具を構成する担体並びに溶連菌及び／又は溶連菌由来成分があらかじめ脱離しないように、収納容器内部に固定化されていても良く、このような場合の流出防止機構としては、例えば、流出防止用の分離膜や分離フィルター等が挙げられる。また、その他の流出防止機構としては、例えば、遠心操作等によって血液又は血液成分等と分離する機構等が挙げられる。

10 必要によっては、サイトカインを誘導した血液又は血液成分等から液性成分等を分離して治療等に用いてもよい。

本発明のサイトカイン誘導用具の一実施態様としては、例えば、導入部と導出部を有する血液バッグに、OK-432を固定化させた、粒子状、纖維状、不織布状等の担体から構成された本発明のサイトカイン誘導用具に血液又は血液成分等を導入する。必要に応じて、サイトカインを誘導した血液又は血液成分等を導出部から取り出し利用することができる。

15 20 本発明のサイトカイン誘導用具を用いて、本発明のサイトカイン誘導方法により誘導されるサイトカインとしては特に限定されないが、中でも、インターフェロン γ (IFN- γ)、インターロイキン10 (IL-10)、インターロイキン12 (IL-12)、腫瘍壞死因子- α (TNF- α) 等が好適に挙げられる。更に好適なサイトカインとしては、25 後の実施例からも明らかなどおり、誘導されるサイトカイン量が担体により増強されるインターフェロン γ (IFN- γ) が好ましい。IFN

− γ はアレルギー性疾患、癌等のさまざまな疾患において非常に重要な役割を担っているサイトカインであり、IFN− γ を誘導することによりこれらの疾患に対する治療効果が期待できる。

本発明のサイトカイン誘導用具は、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分を用いて、水に不溶性の担体の共存下で実用レベル相当量のサイトカインを誘導できる画期的なものである。容器内で、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分単剤よりもかなり高いレベルのサイトカイン量を誘導することができ、サイトカインが有効である種々の疾患の治療に好適に用いることができる。さらに、本発明のサイトカイン誘導用具では、体外で血液又は血液成分等と接触させてサイトカインを誘導するものであり、必要に応じて、サイトカイン誘導後に副作用が発現する可能性のある溶連菌及び／又は溶連菌由来成分等を除去してから治療に用いることができる。従って、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分を投与する方法よりも、副作用がほとんどない安全性の高い治療を達成することができる。

15

図面の簡単な説明

図1は、本発明のサイトカイン誘導用具の一例を示す模式的断面図である。

20 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を挙げて本発明をより詳しく説明する。なお、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

尚、ヒト及びラット血漿中のIFN− γ の測定は、R&D Systems社製ELISAキット、ENDOGEN社製ELISAキット、又25は、ジェンザイム・テクネ社製ELISAキットにて行なった。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び後述する実施例1と同様に

血液のみを処理した後において、血漿中 IFN- γ の値は全て 10 pg / mL 以下であった。同様に、用いたラットの血液の採血直後及び実施例 1 と同様に血液のみを処理した後において、血漿中 IFN- γ の値は全て 40 pg / mL 以下であった。

5 (実施例 1)

担体 1 (粒子状ポリスチレン系高分子材料、三菱化学社製、商品名：ダイヤイオン HP-50) をメタノール (和光純薬社製、HPLC 用) にてデカンテーションにより洗浄し、しかる後精製水 (大塚製薬社製) にてデカンテーションすることにより洗浄した。次に、注射用生理食塩水 (大塚製薬社製) にて担体 1 をデカンテーションにより洗浄し、粒子かさ体積で 20 μ L の担体 1 を滅菌済みチューブ (ダイヤアトロン社製、エッペンドルフチューブ 1.5 mL 用) に充填した。

また、健常人から採血し、ヘパリン 15 IU / mL 含有静脈血を得た。その後、OK-432 (中外製薬社製、商品名：ピシバニール) を、0.1 KE / mL の濃度となるように各血液に添加した。尚、OK-432 は、生理食塩水で調製されたものであり、生理食塩水が血液に対して 1 % となるように調製した。OK-432 が添加された血液を、担体 1 がかさ体積で 20 μ L 充填された上記チューブに、チューブの目盛りが 1.5 mL となるように添加した。すなわち、血液を 1.48 mL 添加した。

次に、チューブを転倒混和して血液を攪拌し、ロータリーミキサー (TAITEC 社製) に取り付け、6 rpm で転倒混和させつつ、37 °C にて 24 時間恒温槽中でインキュベートした。インキュベート後の血液を 4 °C で 3500 rpm (トミー精工社製、微量高速遠心機 MRX-150) で 15 分間遠心し、しかる後血漿を採取し、-20 °C で該血漿を凍結保存した。しかる後、保存された血漿を、融解し、Human IFN- γ ELISA キット (R&D System 社製又は ENDOG

E N社製)にて血漿中のIFN- γ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

(実施例2、3)

担体1のかさ体積を表1に示した所定量とし、かつ、OK-432が5 添加された血液のチューブへの添加量を(1.5mL-担体1のかさ体積)としたことを除いては、実施例1と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

(比較例1)

担体1を用いなかつたこと、及び、OK-432が添加された血液の10 チューブへの添加量を1.5mLとしたことを除いては、実施例1と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

(比較例2~4)

OK-432を血液に添加しなかつたことを除いては、それぞれ実施例1~3と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表1に示15 した。

表1

	担体1	OK-432の濃度	IFN- γ 誘導量
	かさ体積(μ L)	(KE/mL)	(pg/mL)
実施例1	20	0.1	360
実施例2	50	0.1	367
実施例3	100	0.1	323
比較例1	—	0.1	114
比較例2	20	—	<10
比較例3	50	—	<10
比較例4	100	—	<10

(実施例4)

担体1に替えて、担体2(粒子状ポリスチレン系高分子材料、オルガ20 ノ社製、商品名:アンバーライトXAD-2000)を用いたことを除

いては、実施例 2 と同様にして、血漿中の IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

(実施例 5)

担体 2 のかさ体積を 100 μ L としたこと、及び、OK-432 が添加された血液のチューブへの添加量を 1.4 mL としたことを除いては、実施例 4 と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

(比較例 5)

担体 2 を用いなかったこと、及び、OK-432 が添加された血液のチューブへの添加量を 1.5 mL としたことを除いては、実施例 4 と同様にして、IFN- γ の誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

(比較例 6、7)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例 4、5 と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

表 2

	担体2	OK-432の濃度	IFN- γ 誘導量
	かさ体積(μ L)	(KE/mL)	(pg/mL)
実施例4	50	0.1	251
実施例5	100	0.1	236
比較例5	—	0.1	117
比較例6	50	—	<10
比較例7	100	—	<10

次に、ラット血液におけるサイトカイン誘導について実施例 6、7 及び比較例 8～10 において検討した。

20 (実施例 6)

実施例 2 と同様にして、かさ体積 50 μ L の担体 1 を充填した滅菌済

みチューブを得た。

ウイスター ラット（7週齢、雄、日本SLC社より購入）よりヘパリ
ン 15 IU/mL 含有静脈血を採取した。この血液に、0.1 KE/mL
濃度となるように、OK-432（中外製薬社製、商品名：ピシバニ
5 ル）を添加した。なお、OK-432は RPMI 1640 培地で調製
されたものであり、RPMI 1640 培地が血液に対して 20% となる
ように調製した。OK-432 が添加された血液を上記担体 1 が充填さ
れたチューブに、目盛りが 1.5 mL となるように添加した。

以下、実施例 2 と同様にして血漿を採取し、ラット IFN- γ 定量キ
10 ット（ジェンザイム・テクネ社製）を用いて IFN- γ 誘導量を測定し
た。結果を表 3 に示した。

（実施例 7）

担体 1 のかさ体積を 500 μ L としたこと、及び、OK-432 が添
加された血液のチューブへの添加量を 1.0 mL としたことを除いては、
15 実施例 6 と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 3 に示
した。

（比較例 8）

担体 1 を用いなかったこと、及び、OK-432 が添加された血液の
チューブへの添加量を 1.5 mL としたことを除いては、実施例 6 と同
20 様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

（比較例 9、10）

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施
例 6、7 と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 3 に示
した。

表 3

	担体1	OK-432の濃度	IFN- γ 誘導量
	かさ体積(μL)	(KE/mL)	(pg/mL)
実施例6	50	0.1	251
実施例7	500	0.1	435
比較例8	—	0.1	72
比較例9	50	—	<40
比較例10	500	—	<40

(実施例 8 ~ 15)

担体 1 (粒子状ポリスチレン系高分子材料、三菱化学社製、商品名 :
 5 ダイヤイオンHP-50)、担体 2 (粒子状ポリスチレン系高分子材料、
 オルガノ社製、品番 : アンバーライト XAD-2000)、担体 3 (粒
 子状ポリスチレン系高分子材料、オルガノ社製、品番 : アンバーライト
 XAD-2)、担体 4 (粒子状ポリスチレン系高分子材料、オルガノ社
 製、品番 : アンバーライト XAD-4)、担体 5 (粒子状ポリスチレン
 系高分子材料、オルガノ社製、品番 : アンバーライト XAD-16HP)、
 10 担体 6 (粒子状ポリアクリルエステル系高分子材料、オルガノ社製、品
 番 : アンバーライト XAD-7) 担体 7 (粒子状ポリプロピレン系高
 分子材料、射出成型用ペレット)、及び担体 8 (粒子状ポリ塩化ビニル系
 高分子材料、射出成型用ペレット) を用いた以外は、実施例 2 と同様に
 15 して、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 4 に示した。

(比較例 11)

担体を用いなかったこと、及び、OK-432が添加された血液のチ
 ューブへの添加量を 1.5 mLとしたことを除いては、実施例 8 と同様
 にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 4 に示した。

20 (比較例 12 ~ 19)

OK-432を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施

例8～15と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表4に示した。

表4

	担体	材質	OK-432 濃度 (KE/mL)	IFN- γ 誘導量
	かさ体積(50 μ L)			(pg/mL)
実施例8	担体1	ポリスチレン	0.1	360
実施例9	担体2	ポリスチレン	0.1	255
実施例10	担体3	ポリスチレン	0.1	238
実施例11	担体4	ポリスチレン	0.1	378
実施例12	担体5	ポリスチレン	0.1	205
実施例13	担体6	ポリアクリルエステル	0.1	303
実施例14	担体7	ポリプロピレン	0.1	342
実施例15	担体8	ポリ塩化ビニル	0.1	356
比較例11	なし	—	0.1	104
比較例12	担体1	ポリスチレン	—	<10
比較例13	担体2	ポリスチレン	—	<10
比較例14	担体3	ポリスチレン	—	<10
比較例15	担体4	ポリスチレン	—	<10
比較例16	担体5	ポリスチレン	—	<10
比較例17	担体6	ポリアクリルエステル	—	<10
比較例18	担体7	ポリプロピレン	—	<10
比較例19	担体8	ポリ塩化ビニル	—	<10

5 (実施例16～23)

担体9（石油ピッチ系球状活性炭、比表面積800 m^2/g 以上、粒径200～400 μm 、呉羽化学社製、商品名：クレメジン細粒（慢性腎不全用剤））、担体10（石油ピッチ系球状活性炭、比表面積1100～1300 m^2/g 、粒径400～800 μm 、呉羽化学社製、商品名：BAC-LP）、担体11（フェノール樹脂系球状活性炭、比表面積1000 m^2/g 以上、粒径150～300 μm 、カネボウ社製、商品名：ベルファインAB）、担体12（石油ピッチ系球状活性炭、比表面積800～1200 m^2/g 、粒径500～800 μm 、ジーエルサイエンス社製、商品名：アクティブカーボンビーズ）、担体13（石炭系破碎状活性炭、比表面積1000 m^2/g 以上、径400～1700

μm 、明和工業社製、商品名：CG1040)、担体14(ヤシガラ系破碎状活性炭、比表面積 $800\text{m}^2/\text{g}$ 以上、径 $500\sim1800\mu\text{m}$ 、ナカライテスク社製、商品名：ヤシガラ製活性炭素未洗浄処理品8~32メッシュ)、担体15(フェノール樹脂系円柱状分子篩炭、比表面積 $500\text{m}^2/\text{g}$ 以下、径 $1000\sim4000\mu\text{m}$ 、カネボウ社製、商品名：ベルファインMG)、又は、担体16(フェノール樹脂系円柱状造粒活性炭、比表面積 $1500\text{m}^2/\text{g}$ 以上、径 $1000\sim4000\mu\text{m}$ 、カネボウ社製、商品名：ベルファインBG)を用いた以外は、実施例2と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表5に示した。尚、
10 径は短軸径及び長軸径を示す。

(実施例24~31)

担体9~16をメノウ乳鉢を用いてすりつぶし、粒径 $100\mu\text{m}$ 以下にして用いたことを除いては、それぞれ実施例16~23と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表5に示した。

15 (比較例20)

担体を用いなかったこと、及び、OK-432が添加された血液のチューブへの添加量を 1.5mL としたことを除いては、実施例16と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表5に示した。

(比較例21~28)

20 OK-432を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例16~23と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表5に示した。

表 5

	担体 かさ体積(50 μL)	商品名	OK-432濃度 (KE/mL)	IFN-γ誘導量 (pg/mL)
実施例16	担体9	クレメジン細粒	0.1	526
実施例17	担体10	BAC-LP	0.1	495
実施例18	担体11	ペルファインAB	0.1	531
実施例19	担体12	アクティブカーボンピーズ	0.1	488
実施例20	担体13	CG1040	0.1	376
実施例21	担体14	ヤシガラ製活性炭素	0.1	368
実施例22	担体15	ペルファインMG	0.1	305
実施例23	担体16	ペルファインBG	0.1	581
実施例24	担体9	クレメジン細粒	0.1	230
実施例25	担体10	BAC-LP	0.1	206
実施例26	担体11	ペルファインAB	0.1	244
実施例27	担体12	アクティブカーボンピーズ	0.1	222
実施例28	担体13	CG1040	0.1	217
実施例29	担体14	ヤシガラ製活性炭素	0.1	231
実施例30	担体15	ペルファインMG	0.1	185
実施例31	担体16	ペルファインBG	0.1	255
比較例20	—	—	0.1	104
比較例21	担体9	クレメジン細粒	—	<10
比較例22	担体10	BAC-LP	—	<10
比較例23	担体11	ペルファインAB	—	<10
比較例24	担体12	アクティブカーボンピーズ	—	<10
比較例25	担体13	CG1040	—	<10
比較例26	担体14	ヤシガラ製活性炭素	—	<10
比較例27	担体15	ペルファインMG	—	<10
比較例28	担体16	ペルファインBG	—	<10

(実施例 32)

ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体の担体4（粒子状ポリスチレン系高分子材料、オルガノ社製、品番：アンバーライトXAD-4）をかさ体積で1mLと、1KE/mLのOK-432（中外製薬社製、商品名：ピシバニール）と、0.1容積%ホルマリン（中性緩衝ホルマリン液、和光純薬工業社製）を含有する生理食塩水1mLとを混合し、37°Cにて20時間、回転混和させてOK-432を担体4の粒子表面に物理吸着させた。この後、この粒子を生理食塩水にて充分洗浄した後、かさ体積で100μLを滅菌済みチューブ（ダイアヤトロン社製、1.5mL用）に充填した。

血液にはOK-432を添加しなかったこと、及び、血液のチューブへの添加量を1.4mLとしたことを除いては、実施例1と同様にして、IFN- γ の誘導量を測定した。結果を表6に示した。

(実施例33～38)

5 ホルマリン濃度(容積%)を表6に示した通りとしたことを除いては、実施例32と同様にし、IFN- γ の誘導量を測定した。結果を表6に示した。

(比較例29)

OK-432の物理吸着処理をしていない担体4を使用したこと以外
10 は、実施例32と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表6に示した。

(比較例30)

担体4を用いなかつたこと、及び、0.1KE/mLのOK-432
が添加された血液1.5mLをチューブに添加したことを除いては、実
15 施例32と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表6に示した。

表6

	担体4 かさ体積(100μL)	OK-432濃度 (KE/mL)	IFN- γ 誘導量 (pg/mL)
実施例32	ホルマリン0.1%	—	233
実施例33	ホルマリン0.5%	—	261
実施例34	ホルマリン1.0%	—	280
実施例35	ホルマリン2.0%	—	288
実施例36	ホルマリン3.0%	—	212
実施例37	ホルマリン5.0%	—	255
実施例38	ホルマリン10.0%	—	222
比較例29	物理吸着なし	—	<10
比較例30	—	0.1	96

(実施例39)

20 実施例34と同様に作製したOK-432を粒子表面に物理吸着させ

た担体4をかさ体積で0.8mL、血液バッグ(10mL用)に充填した。健常人から採血して得たヘパリン15IU/mL含有の静脈血10mLをこの血液バッグに導入した。この血液バッグを37°Cで24時間、穏やかに攪拌しながらインキュベートした。この血液中のIFN- γ 誘導量を実施例1と同様に測定した。結果を表7に示した。

5 (実施例40、41)

担体として担体9又は担体16を用いたこと、及び、生理食塩水としてホルマリンを含有しないものを用いたことを除いては、実施例39と同様にして、IFN- γ の誘導量を測定した。結果を表7に示した。

10 (比較例31~33)

OK-432の物理吸着処理をしていない担体4、担体9又は担体16を使用したこと以外は、それぞれ実施例39~41と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表7に示した。

(比較例34)

15 担体8を用いなかつたこと、及び、0.1KE/mLのOK-432が添加された血液10mLを血液バッグに導入したことを除いては実施例39と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表7に示した。

表7

	担体4 かさ体積 (0.8mL)	担体9 かさ体積 (0.8mL)	担体16 かさ体積 (0.8mL)	OK-432濃度 (KE/mL)	IFN- γ 誘導量 (pg/mL)
実施例39	物理吸着	—	—	—	257
実施例40	—	物理吸着	—	—	377
実施例41	—	—	物理吸着	—	420
比較例31	物理吸着なし	—	—	—	<10
比較例32	—	物理吸着なし	—	—	<10
比較例33	—	—	物理吸着なし	—	<10
比較例34	—	—	—	0.1	98

実施例 3 4 と同様に作製した OK-432 を粒子表面に物理吸着させた担体 4 をかさ体積で 4 mL、血液バッグ（50 mL 用）に充填した。健常人から採血して得たヘパリン 15 IU/mL 含有の静脈血 50 mL をこの血液バッグに導入した。この血液バッグを 37 °C で 24 時間、穏やかに攪拌しながらインキュベートした。この血液中の IFN- γ 誘導量を実施例 1 と同様に測定した。結果を表 8 に示した。

(比較例 3 5)

OK-432 の物理吸着処理をしていない担体 4 を使用したこと以外は、実施例 4 2 と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 10 8 に示した。

(比較例 3 6)

担体 4 を用いなかったこと、及び、0.1 KE/mL の OK-432 が添加された血液 50 mL を血液バッグに導入したことを除いては実施例 4 2 と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 15 8 に示した。

表 8

	担体 4 かさ体積 (4mL)	OK-432 濃度 (KE/mL)	IFN- γ 誘導量 (pg/mL)
実施例 42	物理吸着	—	316
比較例 35	物理吸着なし	—	<10
比較例 36	—	0.1	102

(実施例 4 3、4 4)

OK-432 の濃度を 0.01 KE/mL 及び 0.1 KE/mL の 2 用量にした以外は、実施例 2 と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 9 に示した。

(実施例 4 5、4 6)

担体として、担体 9 を用いたこと、及び、OK-432 の濃度を 0.

0.1 KE/mL 及び 0.1 KE/mL の 2 用量にした以外は実施例 2 と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 9 に示した。

(比較例 37、38)

OK-432 を添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例 43、5 45 と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 9 に示した。

(比較例 39、40)

担体 1 を添加しなかったことと、OK-432 が添加された血液のチューブへの添加量を 1.5 mL としたことを除いては、それぞれ実施例 43、44 と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表 9 に示した。

表 9

	担体 1 かさ体積 (μ L)	担体 9 かさ体積 (μ L)	OK-432 濃度 (KE/mL)	IFN- γ 誘導量 (pg/mL) 被採血者		
				A	B	C
実施例 43	50	—	0.01	79	355	128
実施例 44	50	—	0.1	267	466	432
実施例 45	—	50	0.01	145	394	249
実施例 46	—	50	0.1	385	665	512
比較例 37	50	—	—	<10	12	<10
比較例 38	—	50	—	<10	<10	<10
比較例 39	—	—	0.01	<10	94	59
比較例 40	—	—	0.1	84	176	89

(実施例 47)

担体 16 (フェノール樹脂系円柱状造粒活性炭、比表面積 1500 m²/g 以上、径 1000~4000 μ m、カネボウ社製、商品名: ベルファイン BG) を 50 mL チューブにかさ体積で 25 mL 入れ、そこにポリヒドロキシエチルメタクリレート (平均分子量 30 万、SIGMA 社製) を 2% (v/v) 溶解させた 95% エタノール溶液 (ナカライトスク社製) 25 mL を入れ、30 分浸漬後、ステンレス製のかごに移し、20 余分なエタノールを除去した後、80 °C で 20 時間乾燥させて、ポリ (2

一ヒドロキシエチルメタクリレート)が表面にコーティングされた担体17を作製した。その後、担体17をかさ体積で1mLと、5KE/mLのOK-432(中外製薬社製、商品名：ピシバニール)懸濁生理食塩水1mLとを混合し、37°Cにて20時間、回転混和させてOK-432を担体17の粒子表面に物理吸着させた。この後、この粒子を生理食塩水にて充分洗浄した後、かさ体積で100μLを滅菌済みチューブ(ダイアヤトロン社製、1.5mL用)に充填した。

血液にはOK-432を添加しなかったこと、及び、血液のチューブへの添加量を1.4mLとしたことを除いては、実施例1と同様にして、
IFN- γ の誘導量を測定した。結果を表10に示した。
(比較例41)

OK-432の物理吸着処理をしていない担体17を使用したこと以外は、実施例47と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表10に示した。

IFN- γ の誘導量を測定した。結果を表10に示した。

OK-432を物理吸着させた担体17を用いなかったこと、及び、OK-432の濃度を0.01、0.1KE/mLの2用量にした血液1.5mLをチューブに添加したことを除いては、実施例47と同様にして、IFN- γ 誘導量を測定した。結果を表10に示した。

20

表10

	担体17 コーティング処理済	OK-432濃度 (KE/mL)	IFN- γ 誘導量 (pg/mL)
実施例47	物理吸着	—	551
比較例41	物理吸着なし	—	18
比較例42	—	0.01	72
比較例43	—	0.1	95

産業上の利用可能性

本発明のサイトカイン誘導用具は、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分

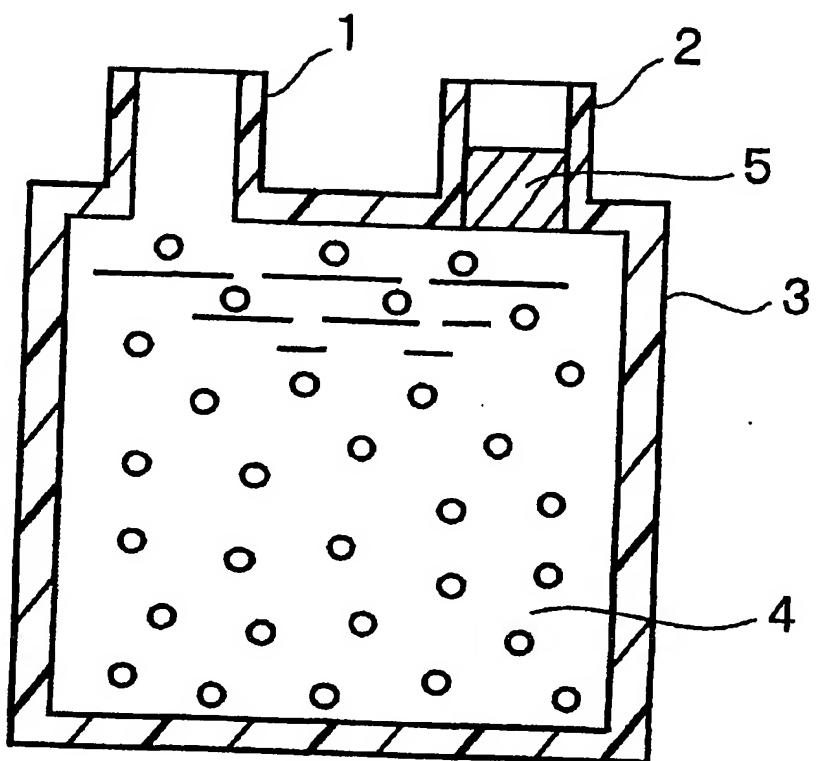
と水に不溶性の担体とを含むので、血液又は血液成分等を添加した場合、本発明のサイトカイン誘導方法により、サイトカインを非常に効果的に誘導することができ、サイトカインの誘導が有効である様々な疾患の治療に非常に有用なものである。

請求の範囲

1. 溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と、水に不溶性の担体とを含む、サイトカイン誘導用具。
- 5 2. 前記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と、水に不溶性の前記担体とを収納している容器を更に備える、請求項1に記載のサイトカイン誘導用具。
3. 水に不溶性の前記担体が、サイトカインの誘導増強作用を有する、請求項1又は2に記載のサイトカイン誘導用具。
- 10 4. 前記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分が、水に不溶性の前記担体に固定化されている請求項1～3のいずれか1項に記載のサイトカイン誘導用具。
5. 水不溶性の前記担体が高分子材料からなることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載のサイトカイン誘導用具。
- 15 6. 前記高分子材料が多孔性高分子材料である請求項5に記載のサイトカイン誘導用具。
7. 前記高分子材料が、ポリスチレン系高分子材料、ポリアクリルエスティル系高分子材料、ポリプロピレン系高分子材料及びポリ塩化ビニル系高分子材料からなる群から選択された少なくとも1種からなる請求項
- 20 5又は6に記載のサイトカイン誘導用具。
8. 水不溶性の前記担体が、炭素材料からなる請求項1～4のいずれか1項に記載のサイトカイン誘導用具。
9. 前記炭素材料が活性炭である請求項8に記載のサイトカイン誘導用具。
- 25 10. 前記活性炭の径が $100\text{ }\mu\text{m}$ を超え、 $1000\text{ }\mu\text{m}$ 以下である活性炭からなる請求項9に記載のサイトカイン誘導用具。

11. 活性炭が、石油ピッチ、フェノール樹脂、石炭及びヤシガラからなる群から選択された少なくとも一種の原材料から得られた活性炭である請求項9または10に記載のサイトカイン誘導用具。
12. サイトカインを産生する細胞におけるサイトカインの産生を誘導するのに用いられる、請求項1～11のいずれか1項に記載のサイトカイン誘導用具。
5
13. 前記サイトカインを産生する細胞が血液または血液成分由來の細胞である、請求項12に記載のサイトカイン誘導用具。
14. 請求項1～13のいずれか1項に記載のサイトカイン誘導用具
10 を用いて、サイトカインを誘導することを特徴とするサイトカイン誘導方法。

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005983

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K35/74, A61K47/32, A61K47/34, A61K47/38, A61K47/48,
 A61P19/02, A61P29/00, A61P37/02, A61P37/08, A61P35/00,
 A61P37/04, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K35/74, A61K47/32, A61K47/34, A61K47/38, A61K47/48,
 A61P19/02, A61P29/00, A61P37/02, A61P37/08, A61P35/00,
 A61P37/04, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 CAP (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 03/37375 A1 (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.), 08 May, 2003 (08.05.03), Full text & JP 2003-201251 A	1-13
X Y	JP 61-277628 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 08 December, 1986 (08.12.86), Full text; Claims; page 2, lower left column, 2nd line from the bottom to page 3, upper left column, 2nd line from the bottom; examples (Family: none)	1-13 3-13

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 July, 2004 (27.07.04)Date of mailing of the international search report
17 August, 2004 (17.08.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005983

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 60-120821 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 28 June, 1985 (28.06.85), Full text & EP 147689 A2 & JP 60-252423 A & JP 61-85317 A & JP 61-87671 A & JP 61-93121 A & JP 61-93122 A & US 4839290 A	1-13 3-13
X Y	WILKINSON, KA. et al., 'Enhancement of the human T cell response to culture filtrate fractions of Mycobacterium tuberculosis by microspheres.', J.Immunol.Methods, (2000), Vol.235, No.(1-2), pages 1 to 9	1-13 3-13
X Y	JP 63-160578 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 04 July, 1988 (04.07.88), Full text; Claims; page 2, lower left column to page 4, lower left column (Family: none)	1-13 3-13
X Y	JP 61-100522 A (Toray Industries, Inc.), 19 May, 1986 (19.05.86), Full text; Claims; page 2, lower left column to page 3, upper left column; examples (Family: none)	1-13 3-13
X Y	JP 63-203623 A (Toray Industries, Inc.), 23 August, 1988 (23.08.88), Full text; Claims; page 2, lower right column to page 3, lower left column; examples (Family: none)	1-13 3-13
Y	Kazutoshi YAMAZAKI et al., 'Shushu no Kobunshi Oyobi Hyomen Arasa o Yusuru Zairyo ni Okeru Zen Kecchu no Karyukyu Kyuchaku Kyodo no Kento', Polymer Preprints, Japan, (1991), Vol.40, No.7, pages 2230 to 2232	3-13
Y	Kazuo NIIMURA et al., 'Somen Sakusan Cellulose Beads no Shuyo Eshi Inshi Yuki Sayo', The Japanese Journal of Artificial Organs, 1993, Vol.22, No.5, pages 1233 to 1237, full text, page 1234, left column, III.1., page 1235, left column, 2nd line from the bottom to page 1236, the last line	3-13
Y	JP 6-209992 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 02 August, 1994 (02.08.94), Full text; Claim 1; page 3, column 4, Par. No. [0016] to page 4, column 5, Par. No. [0027] (Family: none)	3-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005983

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YASUHITO, A. et al., 'The endogenous induction of tumor necrosis factor serum (TNS) for adjuvant postoperative immunotherapy of cancer. -changes in immunological markers of the blood-', Japanese Journal of Surgery, 1990, Vol.20, No.1, pages 19 to 26	1-13
A	Yoshiki RYOMA, 'Hitokuiteki Koakusei Shuyozai Sonogo no Tenkai OK-432(Picibanil) Sonogo no Tenkai', Biotherapy, 2000, Vol.14, No.9, pages 877 to 885	1-13
A	FUJIMOTO, T. et al., 'Streptococcal preparation OK-432 is a potent inducer of IL-12 and a T helper cell 1 dominant state.', J.Immunol., 1997, Vol.158, No.12, pages 5619 to 5626	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2004/005983**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 14

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Even though the contents of the description are taken into consideration concerning the method of inducing a cytokine as set forth in claim 14, it cannot be understood that an embodiment of using an instrument for inducing a cytokine as set forth in any of claims (continued to extra sheet)

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005983

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

1 to 13, particularly *in vivo*, is clearly excluded therefrom. Therefore, it is recognized that this claim involves an embodiment relating to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/005983

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' A61K35/74, A61K47/32, A61K47/34, A61K47/38, A61K47/48, A61P19/02, A61P29/00,
A61P37/02, A61P37/08, A61P35/00, A61P37/04, A61P43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' A61K35/74, A61K47/32, A61K47/34, A61K47/38, A61K47/48, A61P19/02, A61P29/00,
A61P37/02, A61P37/08, A61P35/00, A61P37/04, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAP(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), WPI, JOIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO 03/37375 A1 (SEKISUI CHEMICAL CO LTD) 2003.05.08 全体 & JP 2003-201251 A	文献 1-13

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.07.2004

国際調査報告の発送日

17.8.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

大久保元浩

4C 8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 61-277628 A (旭化成工業株式会社) 1986.12.08 文献全体、	1-13
Y	特許請求の範囲、p.2左下欄下から第2行-p.3左上欄下から第2行、 実施例 (ファミリーなし)	3-13
X	JP 60-120821 A (旭化成工業株式会社) 1985.06.28 文献全体	1-13
Y	& EP 147689 A2 & JP 60-252423 A & JP 61-85317 A & JP 61-87671 A & JP 61-93121 A & JP 61-93122 A & US 4839 290 A	3-13
X	WILKINSON, KA et al. 'Enhancement of the human T cell response to culture filtrate fractions of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> by microspheres.' J. Immunol. Methods, (2000) vol. 235 no. (1-2) p. 1-9	1-13
Y		3-13
X	JP 63-160578 A (旭化成工業株式会社) 1988.07.04 文献全体、	1-13
Y	特許請求の範囲、p.2左下欄-p.4左下欄 (ファミリーなし)	3-13
X	JP 61-100522 A (東レ株式会社) 1986.05.19 文献全体、特許請	1-13
Y	求の範囲、p.2左下欄-p.3左上欄、実施例 (ファミリーなし)	3-13
X	JP 63-203623 A (東レ株式会社) 1988.08.23 文献全体、特許請	1-13
Y	求の範囲、p.2右下欄-p.3左下欄、実施例 (ファミリーなし)	3-13
Y	山崎和俊他 '種々の高分子および表面粗さを有する材料における全血中の粒球吸着挙動の検討' 高分子学会予稿集, (1991) vol. 40, no. 7 p. 2230-2232	3-13
Y	新村和夫他 '粗面酢酸セルロースビーズの腫瘍壊死因子誘起作用' 人工臓器, 1993, VOL. 22, NO. 5, p. 1233-1237 文献全体、p. 1234左欄III. 1.、p. 1235左欄下から第2行-p. 1236文献末尾	3-13
Y	JP 6-209992 A (積水化学工業株式会社) 1994.08.02 文献全体、 請求項1、第3頁第4欄【0016】-第4頁第5欄【0027】 (ファミリーなし)	3-13

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	YASUHITO, A. et al. 'The endogenous induction of tumor necrosis factor serum (TNS) for adjuvant postoperative immunotherapy of cancer. - changes in immunological markers of the blood - ' Japanese Journal of Surgery, 1990, vol. 20, no. 1, p. 19-26	1-13
A	両馬良樹 '非特異的抗悪性腫よう剤 その後の展開 OK-432 (ピシバニール) その後の展開' Biotherapy, 2000, vol. 14, no. 9, p. 877-885	1-13
A	FUJIMOTO, T. et al. 'Streptococcal preparation OK-432 is a potent inducer of IL-12 and a T helper cell 1 dominant state.' J. Immunol., 1997, vol. 158, no. 12, p. 5619-5626	1-13

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 14 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求項14のサイトカイン誘導方法については、明細書の内容を参照しても、請求項1～13のいずれかに記載のサイトカイン誘導用具を特に生体内で適用する態様が明確に除外されているとは理解できないから、治療による人体の処置方法に係る態様を含むものと認められ、よってPCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。